Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 33, No. 1, Spring 2023 **ORIGINAL ARTICLE**

Investigating the effect of *B. thetaiotaomicron* and its derivatives on the expression of *tlr2* and *tlr4* genes in STC-1 cell line

Somaye Vaezijoze[1], Shiva Irani[1], Seyed Davar Siadat[2,3], Mohammadreza Zali[4]
[1] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3]Microbiology Research Center (MRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[4]Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-08]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.1.3]

[DOI: 10.52547/iau.33.1.1]

Abstract

Background: *B. thetaiotaomicron* is introduced as a candidate for the next generation of probiotics. TLR2, 4 play an important and necessary role in activating and modulating the innate immune system after exposure to bacteria in the intestine. This study aimed to investigate the effect of *B. thetaiotaomicron* and its derivatives on the alteration of the *tlr2* and *tlr4* gene expression.

Materials and methods: The effects of *B. thetaiotaomicron*, OMVs, inactive bacteria and supernatant treatments on the *tlr2* and *tlr4* gene expression in the STC-1 cell line were investigated using the qRT-PCR method.

Results: The treatment of the STC-1 cell line with live and active *B. thetaiotaomicron* did not have significant effect on transcription of *tlr2, 4*. The OMVs of this bacterium at 50 µg/ml significantly increased the gene expression of *tlr2* (p=0.01) and *tlr4* (p=0.02), but at a concentration of 100 µg/ml, its effect was not significant. Inactive bacteria at MOI 10 (p=0.03) and MOI 50(p=0.003) significantly induce the transcription of both two genes. Supernatant 25% significantly increased *tlr2 (p=0.038) and tlr4 (p=0.034)* gene expression at the transcription level.

Conclusion: Our results showed that OMVs at a concentration of 50 µg/ml, inactive bacteria, and supernatant *B. thetaiotaomicron* play an important role in modulating immune response and can be used as a next generation postbiotics and paraprobiotic candidates for further studies to be used.

Keywords: *B.thetaiotaomicron, Microbiota, OMVs, TLR2, TLR4.*

Cited as: Vaezijoze S, Irani SH, Siadat SD, Zali MR. Investigating the effect of *B. thetaiotaomicron* and its derivatives on the expression of *tlr2* and *tlr4* genes in STC-1 cell line. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2023; 33(1): **1-10.**

Correspondence to: Seyed Davar Siadat
Tel: *+ 02164112282*
E-mail: d.siadat@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-6892-5603
Received: 7 Sep 2022; **Accepted:** 15 Oct 2022

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲، صفحات ۱ تا ۱۰

Original Article

بررسی اثر باکتری *B. thetaiotaomicron* و مشتقات آن بر بیان ژن های *tlr2,tlr4* در رده سلولی STC-1

سمیه واعظی جزء[۱] ، شیوا ایرانی[۱] ،سید داور سیادت[۲،۳] ، محمدرضا زالی[۴]

[۱] گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران
[۲]بخش سل وتحقیقات ریوی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۳]مرکز تحقیقات میکروب شناسی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۴] مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *باکتری B. thetaiotaomicron به عنوان کاندید نسل جدید پروبیوتیک ها مطرح است. TLR2,4 در روده نقش مهم و ضروری در شناسایی و فعالسازی سیستم ایمنی ذاتی ، پس از مواجهه با باکتری ها برعهده دارند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر باکتری B. thetaiotaomicron و مشتقات آن برتغییرات بیان ژن های tlr2,tlr4 بود.*

روش بررسی: *بررسی تاثیر تیمارهای B. thetaiotaomicron، OMVs ، باکتری غیر فعال و سوپرناتانت بر بیان ژنهای tlr2,tlr4 در رده سلولی STC-1 با استفاده از روش qRT-PCR انجام شد.*

یافته‌ها: *تیمار رده سلولی STC-1 با باکتری زنده و فعال B. thetaiotaomicron در تغییر بیان دو ژن tlr2,4 تاثیر معنی داری نداشتند. اثر OMVs این باکتری در افزایش بیان دو ژن tlr2 وtlr4 در غلظت ۵۰µg/ml معنی‌دار (p=۰/۰۱ ،p=۰/۰۲) بود، ولی در غلظت ۱۰۰µg/ml تغییرات معنی‌دار نبود. باکتری غیرفعال در MOI 10 و MOI 50 تاثیر معنی داری در افزایش دو ژن داشت (به ترتیب p=۰/۰۳ ،p=۰/۰۰۳). سوپرناتانت ۲۵درصد به صورت قابل توجهی بیان دو ژن tlr2 (p=۰/۰۳۸)، tlr4 (p=۰/۰۳۴) را در سطح رونویسی افزایش داد.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این تحقیق نشان داد که OMVs در غلظت ۵۰ میکروگرم برمیلی لیتر، باکتری غیر فعال و سوپر ناتانت B. thetaiotaomicron نقش مهمی در تقویت سیستم ایمنی و ایمنی زایی ایفا می‌کنند و می‌توانند به عنوان کاندید نسل جدید پست بیوتیک و پاراپروبیوتیک جهت مطالعات بعدی مورد استفاده قرار بگیرد.*

واژگان کلیدی: *باکتری B. thetaiotaomicron، OMVs، میکروبیوتا، TLR2, TLR4.*

مقدمه

اکوسیستم‌های میکروبی پیچیده‌ای، پوست، سطوح مخاطی و دستگاه گوارش تمام پستانداران از جمله انسان را اشغال کرده‌اند، که میکروبیوم (microbiom) نامیده می‌شوند. بیش از ۱۰۰تریلیون (هزار میلیارد) میکروارگانیسم درون و روی بدن انسان همزیستی دارند که می‌توانند نقش مهمی در سلامت و بیماری انسان ایفا کنند. به مجموعه‌ای از میکروارگانیسم ها که در ارگان‌های مختلف با محیط خارج از بدن ارتباط دارند میکروبیوتا (microbiota) گفته می‌شود که درسطوح و لایه های عمقی پوست، دهان، ریه، واژن و روده زندگی می‌کنند (۱, ۲). بزرگترین و متنوع‌ترین جمعیت میکروبی همزیست با انسان در دستگاه گوارش دیده می‌شود. جمعیت میکروبی دستگاه گوارش اکوسیستمی پویا و چندلایه‌ای را تشکیل می‌دهند؛ به این ترتیب که با یک الگوی استقرار مشخص همراه با گرادیان

آدرس نویسنده مسئول: تهران، بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران سمیه واعظی جزء (**email**: d.siadat@gmail.com)
ORCID ID: 0000-0002-6892-5603
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۷/۲۳

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-08]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.1.3]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.1]

افزایشی غلظت، از لومن گاستریک به سمت روده کوچک تا کولون و رکتوم به بیشترین مقدار خود می‌رسند (۳).

میکروبیوتا عملکردهایی متنوع و گسترده از جمله ایمنی‌زایی، کنترل تکثیر و تمایز سلول‌های اپیتلیال روده، رشد و توسعه سد اپیتلیالی، استحکام اتصالات محکم ناحیه اپیکال، محافظت در برابر گونه‌های بیماری‌زا، تخمیر کربوهیدرات های غیر قابل هضم برای تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (SCFA)، متابولیسم اسیدهای صفراوی و تخریب مواد سرطان‌زا در رژیم غذایی در محافظت از ایجاد سرطان دارند (۴). اختلال و به هم خوردن تعادل در چنین سیستم پیچیده‌ای می‌تواند منجر به وضعیتی به نام اختلال درهمزیستی شود که به طور بالقوه میزبان را برای چندین بیماری مهم مستعد می‌کند، بیماری‌های مزمنی نظیر سندروم متابولیک (مانند چاقی و دیابت)، بیماری‌های التهابی شکمی، دیابت ملیتوس، آترواسکلروزیس، بیماری کبد الکلی ALD کبد چرب غیر الکلی، سیروز وکارسینومای کبدی کند که ارتباط همگی آنها با میکروبیوتای روده اثبات شده است (۵, ۶).

تعدیل میکروبیوتای روده برای حفظ تعادل مطلوب و بهبود سلامت انسان از اهمیت بالایی برخوردار است. در این میان مصرف پروبیوتیک‌ها (probiotic)، به عنوان مکمل‌های غذایی اثرات مختلف مفیدی بر عملکرد روده دارد و در اکثر موارد با بهبود دیس بیوز و تعدیل پاسخ ایمنی میزبان سبب بهبود فرایندهای هضم و همچنین کاهش علائم و پیشرفت بیماری های مختلف می‌شوند (۷). به طور کلی، اصطلاح بیوتیک به استراتژی‌های تغذیه‌ای گفته می‌شود که می‌تواند برای هدایت میکروبیوتای دستگاه گوارش، به سمت وضعیت مطلوب‌تری درجهت سلامت میزبان مورد استفاده قرارگیرد. جدیدترین عضو خانواده بیوتیک‌ها، پست بیوتیک است، یک ترکیب فعال زیستی، تولید شده توسط میکرو ارگانیسم، طی فرآیند تخمیر می‌باشد. اصطلاح پست بیوتیک را می‌توان به عنوان یک چتر برای تمام مترادف ها و اصطلاحات مربوط به اجزای تخمیر میکروبی در نظر گرفت، بنابراین پست بیوتیک‌ها می‌توانند ترکیبات مختلفی از جمله مواد تشکیل‌دهنده سلول و انواع متابولیت‌ها باشند (۸). محیط کشت مایعی که باکتری در آن رشد کرده حاوی انواع متابولیت‌ها، آنزیم‌ها و وزیکول‌هایی است که باکتری ترشح می‌کند. سوپرناتانت حاصل از محیط کشت باکتری CFS (cell free supernatante) به عنوان یک پست بیوتیک می‌تواند کارایی داشته باشد .از دیگر بیوتیک ها می توان به پاراپروبیوتیک‌ها اشاره کرد که ، پروبیوتیک‌های غیرزنده هستند و یا به عبارتی، سلول‌های میکروبی غیرفعال یا شکسته هستند که به طرق مختلف ازجمله حرارت، اشعه گاما، امواج فرا بنفش، تیمارهای شیمیایی و.... غیر فعال شده اند. در بعضی منابع به عنوان باکتری پاستوریزه آورده شده است (۹, ۱۰)

اخیرا اعضای جنس Bacteroides به خصوص باکتری(B.thetaiotaomicron) Bacteroides thetaiotaomicron در مطالعات متعدد به عنوان سویه مناسبی از نسل جدید پروبیوتیک ها در نظر گرفته شده است (۱۱).

این باکتری، نوعی باکتری میله‌ای، گرم منفی و بی‌هوازی است که در دستگاه گوارشی به عنوان یک باکتری کومنسال مستقر است، حدود ۶ ٪ از فلور نرمال گات و ۱۰-۱۲ ٪ از باکتروئیدس‌ها را تشکیل می‌دهد و با توجه به آنزیم‌های فراوانی که جهت هیدرولیز پلی ساکاریدهای غیرقابل هضم دارد، جزو فراوان‌ترین مصرف‌کنندگان کربوهیدرات‌های گات معرفی می‌شود این باکتری به عنوان مدلی جهت مطالعه برهمکنش‌های میزبان-باکتری به‌کار می‌رود این باکتری دارای طیف وسیعی از گلیکوزید هیدرولازهاست که توانایی شکستن تعداد زیادی از باندهای آلفا گلیکوزیدی را دارند. می‌توان گفت که نقش آنزیماتیک این باکتری در دستگاه گوارش بسیار پررنگ است و این باکتری‌ها بدون شک یک برتری رقابتی در روده خواهند داشت (۱۲). B.thetaiotaomicron سیگنالینگ کلسیم داخل سلولی را تقویت و از تخریب آنزیم های در برابر پروتئازهای موجود دردستگاه گوارش محافظت می کند، به علاوه به ترشح وزیکول های خارج سلولی(Outer –Membrane Vesicles(OMVs به روشی وابسته به سولفاتاز، ماکروفاژهای روده را تعدیل می کند(۱۳).

واکنش های متقابل بین میزبان و میکروبیوتای روده، شبکه ای پیچیده از مولکول های فعال بیولوژیکی و مسیرهای متابولیکی است، که به طور مشخص توسط میکروارگانیسم های روده ترشح و تنظیم می شوند. برخی از این مواد تنظیمی از وزیکول های خارج سلولی بسته بندی و آزاد می شوند (۱۴). OMVs با انتقال به اندا م های مختلف حتی مغز، می توانند نقش کلیدی و گسترده ای در تعاملات باکتری-باکتری و باکتری-میزبان، پاسخ های ایمنی و متابولیکی، هموستاز ایمنی و واکنش های التهابی حاد و تعدیل مسیرهای مختلف سیگنالینگ را داشته باشند(۱۵).

OMVها به عنوان رابط بین سلولی، انتقال ترکیبات فعال بین سلول ها را تسهیل می کنند. الگوی مولکولی OMVs مرتبط با میکروب (MAMPs) مانند پپتیدوگلیکان، لیپوپلیساکارید(LPS) ، لیپوپروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-08]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.1.3]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.1]

(DNAو RNA) OMVs را قادر می‌سازند که با کمک گیرنده-های تشخیص الگو (PRRs) در تعامل با سلول های میزبان، مسیرهای سیگنالینگی را فعال می کنند که بیان سایتوکاین ها و کموکاین ها را سبب می شود (۱۶). استفاده از OMVs در برخی موارد که استفاده از باکتری های زنده در افراد با نقص سد روده یا نقص سیستم ایمنی می‌تواند خطرناک باشد، جایگزین مناسبی برای پروبیوتیک‌های زنده در نظر گرفته شده است (۷)

همان طور که ذکر شد، میکروبیوتای دستگاه گوارش درتوسعه و تنظیم سیستم ایمنی و بهبود سد گوارشی مشارکت دارد. میکروبیوتای دستگاه گوارش نقش مهمی در مسیرهای سیگنالینگ مخاط روده ازطریق Toll-like (TLRs) receptors و domain-containing protein 1 and Nucleotide-binding 2(NOD1and NOD2) oligomerization ایفا می‌کند (۱۷).

TLRها یکی از ۱۰ نوع پروتیین های گذرنده از غشا (transmembrane proteins) هستند که به عنوان گیرنده‌های شناسایی الگو (Pattern Recognitio Receptors, PRR) شناخته می‌شوند و در سیستم ایمنی ذاتی نقش بسیارمهمی دارند. این گیرنده‌ها در اکثر سلول‌های اپیتلیال و سلول‌های ایمنی بیان میشوند (۱۸). این گیرنده‌ها داری موتیف‌های مولکولی حفاظت شده‌ای هستند که الگوهای مولکولی وابسته به عوامل بیماری‌زا و مولکول‌های عفونی را شناسایی می‌کنند (۱۹). تاکنون ۱۳نوع TLR شناسایی شده است که TLR2,4,5,9 از مهم‌ترین آنها هستند. TLR2 لیپوپلی ساکارید، پپتیدوگلیکان و گلیکولیپیدها را در دیواره سلولی شناسایی می‌کند و TLR4 عمل شناسایی لیپوپلیساکارید باکتری های گرم منفی را بر عهده دارد (۷). میکروبیوتای روده از طریق فعال کردن گیرنده‌های TLR2, 4 و به دنبال آن مسیر های آبشاری PI3k و MAPK, NF-kB موجب فعال شدن پاسخ های ایمنی سلول های اپیتلیالی و نیز سلول‌های ایمنی در روده می‌شود. بدین ترتیب سبب بهبود عملکرد سد اپیتلیالی و افزایش بیان پروتئین های اتصالات محکم و در پی آن مقاومت روده در برابر نشت عوامل بیماری زا و ایمنی نسبت به بیماری‌هایی مانند IBD، چاقی، دیابت هیپرگلایسمی و نیز سرطان می‌شوند (۲۰).

در این مطالعه از یک رده سلولی موشی، مدل سلول‌های انتروانددوکرینEEC (Enteroendocrine cell) به نام STC-1 (The intestinal secretin tumor cell line) به عنوان رده سلولی مناسب برای مطالعات TLRها استفاده شد (۲۱).

ما در این مطالعه به بررسی برخی از اثرات باکتری B. thetaiotaomicron به عنوان کاندید پروبیوتیک و OMVs و CFS حاصل آن به عنوان کاندیدپست بیوتیک و نیز باکتری غیر فعال شده با حرارت به عنوان کاندید پاراپروبیوتیک بر بیان دو ژن گیرنده های غشا tlr2 و tlr4 به روش qRT-PCR خواهیم پرداخت.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده

محیط های کشت Agar1 BHI (cat شرکت BHI-3 QULAB, N0:QB-65-6491) Broth(cat:QB:39-0303)، دستگاه پمپ خلأ آنوکسومات مدل AN20Pکمپانی MART، محیط کشت سلول شرکت Gorgen(cat:E0500-190) ، FBS غیر فعالGibco™, MA, USA (cat:10099133)، Gibco™, MA, اسید آمینه های غیر ضروری وbio idea (وcat:10099133) Gibco™, MA, USA شده. تریپسین (cat:2520056) EDTA 0/25 % (Gibco™, MA, USA)، کیت استخراج mRNA یکتا تجهیز (Cat# YT9066) و کیت سنتز cDNA یکتا تجهیز، (cat No:YT4500) استفاده شد.

کشت سوش باکتری

در این مطالعه سویه استاندارد(۱۰۷۷۴ *B.thetaiotaomicron* ATCC) ازکلکسیون نگهداری باکتری‌های انیستیتوپاستور تهیه شد. برای فعال شدن و کشت این باکتری بی هوازی، از محیط های کشت BHI استفاده شد. به منظور فعال سازی، احیاء و شروع استفاده ازاین سوش استاندارد باکتری، ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع BHI غنی شده با همین، منادیون و ال سیستئین , با استفاده ازسرنگ استریل به داخل ویال باکتری تزریق و هموژن گردید. سپس ۲۰۰ ماکرولیتر از سوپرناتانت هموژن شده به چند پلیت از محیط کشت BHI آگار اضافه و با استفاده از سواپ استریل کشت داده شد و به درون جار بی هوازی منتقل گشت. سپس با استفاده از دستگاه پمپ خلأ آنوکسومات حاوی(CO2:10%,H2:10% ، N2:80%)، شرایط بی هوازی برای رشد باکتری فراهم گردید. جهت رشد باکتری، جار به مدت ۳ الی ۵ روز در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل شد.

تایید هویت باکتری با استفاده ار PCR با پرایمر مبتنی بر ژن sRNA۱۶ ازباکتری *B.thetaiotaomicron* انجام گرفت (طبق مطالعه انجام شده توسط گروه حاضر در تحقیق) (۲۱).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-08]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.1.3]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.1]

در همین راستا وزیکول‌های غشای خارجی باکتری گرم منفی *B.thetaiotaomicron* بعداز کشت ۲۴ساعته باکتری در محیط BHI غنی شده با همین و منادیون با استفاده از روش های مبتنی بر اولتراسانتریفیگاسیون و اولترافیلتراسیون استخراج گردید سپس ساختارهای این ماکرومولکول ها مورد ارزیابی فیزیکوشیمیایی قرار گرفتند (۲۲). سپس جهت بررسی سایز و شکل وزیکول های استخراج شده، ازهردو میکروسکوپ اکترونی TEMو SEM استفاده شد. با استفاده از روش Bradford غلظت پروتئینی وزیکول های غشا خارجی *B.thetaiotaomicron* بدست آمد (طبق مطالعه انجام شده توسط گروه حاضر در تحقیق) (۲۳).

جهت غیر فعال کردن این باکتری، *B.thetaiotaomicron* بر روی پلیت BHI agar حاوی مکمل های همین، منادیون و L-سیستئین با مقادیری که قبلا ذکر گردید، کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت از کلنی باکتری برداشت نموده و در ۱/۵ میلی لیتر محلول PBS استریل تلقیح شد. پس از کنترل رشد باکتری از طریق خوانش جذب نوری ۱ در ۶۰۰ نانومتر ، سوسپانسیون حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در داخل بن ماری ۷۰درجه ساتیگراد حرارت دهی شد و به صورت تازه بر روی رده سلولی تیمار شد (۲۱).

به منظور به دست آوردن سوپرناتانت عاری از سلول(CFS) از باکتری *B. thetaiotaomicron*، ابتدا باکتری در محیط BHI مایع غنی شده با همین و منادیون و ال سیستئین به حجم ۱۰۰ سی سی تلقیح گردید، سوسپانسیون حاصله در شرایط بی هوازی (N2:80%، CO2:10%,H2:10%) و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس به مدت ۲۲ ساعت داخل انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۷ درجه سانتیگرادقرار گرفت تا به حداکثر میزان رشد خود (فاز لگاریتمی) برسد. جهت اطمینان از میزان رشد باکتری، با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر جذب در OD ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. در ادامه، برای جداسازی فاز مایع از سوسپانسیون حاوی باکتری، سوسپانسیون به فالکون منتقل گردید و در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سوسپانسیون حاصل، به جهت عاری شدن از باکتری، توسط فیلتر ۰/۲۲ عبور داده شد و در نهایت pH آن در حدود ۷-۷/۴ تنظیم گردید تا بتوان سلول را با آن تیمار کرد و در فریزر ۷۰- نگهداری شد (۲۱).

کشت رده سلولیSTC-1

رده سلولی STC-1 (۲۱)، یک رده سلولی موشی به صورت چسبنده با رشد آهسته و زمان دو برابر شدن۵۴ساعت است که از بانک سلولی بلژیک (ATCC® CRL 3254) تهیه شده است. محیط کشت مورد استفاده DMEM high Glucose ، حاوی FBS۱۲٪/۵ غیرفعال ، به همراه آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین U/ml1000 می باشد. سلول ها چندین نسل در فلاسک های مخصوص کشت سلولی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ ٪ co2 پاساژ داده شد. هر ۲ تا ۳ روز یک بار، محیط کشت سلول ها تعویض شد. قابل ذکر است که شرط اول در کشت سلولی،مهیا کردن شرایط استریل است. بنابراین قبل و بعداز کار، تمام محیط و وسایل کار استریل می‌شوند.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری جهت تیمار با سلول

بدین صورت که ابتدا سوسپانسون باکتری بوسیله PBS مشابه با مک فارلند ۱تهیه گردید که حاوی $۱۰^{۸}$ × ۳باکتری در هر ml۱ است، بعد از انجام محاسبات لازم باتوجه به تعداد سلول، دو چاهک برای هر MOI۱۰ و MOI۵۰ (تعدادباکتری به تعداد سلول) اختصاص داده شد.

آماده‌سازی سلول‌های STC1 جهت تیمار با باکتروئیدس تتایتومیکرون و مشتقات آن (باکتری غیرفعال شده باحرارت، OMVs وCFS حاصل از آن)

جهت تیمارسلول‌ها با باکتروئیدس تتایتومیکرون و مشتقات آن، پس از پر شدن فلاسک‌ها و رسیدن به تراکم۷۵ ٪، سلول‌ها تریپسینه و با دور g۱۱۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند، پلت حاصله حل شد و سپس توسط لام نئوبار مورد شمارش قرار گرفت. پس از شمارش، تعداد $۱۰^{۵}$ ×۱/۲سلول به هر چاهک پلیت ۶ خانه منتقل گردید بعد از ۲۴ ساعت و قبل از تیمار سلول‌ها، نیاز است تا سلول‌ها همه در یک فاز رشدی یکسان قرارگیرند، به همین خاطر، محیط کشت سلول‌ها داخل هر چاهک با محیط کشت DMEM 1%FBS (بدون آنتی بیوتیک و اسیدهای آمینه) جایگزین شد و بعد از ۴ ساعت آماده تیمار شد.

مقدار محاسبه شده هر MOI ۱۰و MOI ۵۰ باکتری فعال وغیر فعال شده باحرارت، بصورت جداگانه، به کشت سلول اضافه شد و به مدت۲۰ ساعت در انکوباتور CO2دار انکوبه شد. همچنین OMVs با غلظت‌های ۵۰µg/ml و۱۰۰ و نمونهCFS به میزان ۲۵ ٪ حجم محیط کشت سلول، هر کدام بطور جداگانه به محیط کشت سلول‌ها اضافه شده و به مدت۲۰ ساعت در انکوباتور CO2دار انکوبه شد.

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه به روش qRT-PCR

بعد از تیمار رده سلولی STC-1 با باکتری و مشتقات آن که بالاتر به آن اشاره شد، استخراج RNA از سلول های مورد تیمار ،طبق پروتکل انجام گرفت . کیفیت و کمیت RNA های

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-08]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.1.3]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.1]

استخراج شده با کمک دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ و مشاهده باندهای RNA ریبوزومی مشخص شد (۲۵). در مرحله بعد cDNA طبق دستورالعمل کیت ساخته شد و جهت بررسی تغییر بیان ژن های *tlr2* و *tlr4* در سطح رونویسی از روش ریل تایم و پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. طبق بررسی های انجام شده ژن RPL19[۲] که در شرایط مختلف از پایداری بالایی برخوردار است(۲۶) در این مطالعه به عنوان ژن مرجع انتخاب شد.

پرایمرهای مورد نیاز برای ژن‌های مورد مطالعه پس از انجام BLAST کامل و تایید اختصاصیت آن ها، توسط شرکت رویان توکاژن از شرکت متابیون آلمان تهیه و مورد استفاده قرارگرفت. در جدول۱ مشخصات و توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش qRT-PCR آورده شده است.

تحلیل داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام گرفت. مقادیر گزارش شده به شکل میانگین±انحراف معیار قید شده‌اند. آنالیز تست qRT-PCR در اکسل به روش delta delta CT (روش لیوارک) محاسبه شد. همچنین برای محاسبات آماری داده‌ها از روش‌های one way ANOVA و T test وتست تعقیبی Tukey استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها و رسم نمودارها توسط نسخه ۸ نرم افزار Graphpad prism انجام شد. سطح معنی داری داده‌ها کمتر از ۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثرات باکتری *B.thetaiotaomicron* زنده و فعال، OMVs و CFS حاصل از آن و باکتری غیرفعال شده بواسطه حرارت، بر بیان ژن‌های *tlr2* در سطح رونویسی

با بررسی‌های آماری نتایج مشخص شد که باکتری زنده و فعال *B.thetaiotaomicron* در هر دو MOIs تاثیر معنی داری بربیان ژن *tlr2* درسطح رونویسی نداشته، درصورتی که فرم غیرفعال شده این باکتری به واسطه حرارت، در MOI 10 (p=۰/۰۳) و MOI 50 (p=۰/۰۰۳) سطح mRNA این ژن را به صورت معنی‌داری افزایش داد.

وزیکول‌های غشای خارجی این باکتری در غلظت ۱۰۰ µg/ml تاثیر معنی‌داری در تغییر بیان ژن TLR2 در مقایسه با کنترل (تیمار با Sucrose) نداشتند، در حالی که بیان این ژن در غلظت ۵۰µg/ml OMVs به طور معنی داری افزایش یافت (p=۰/۰۱۴).

مقدار رونویسی ژن tlr2 در اثر تیمار با B.thetaiotaomicron CFS به طور معنی‌داری فزایش یافت (p=۰/۰۳۸).

با در نظر گرفتن RPL19 به عنوان ژن مرجع، در هر تیمار نتایج حاصل از qRT-PCR در مقایسه با نتایج این ژن مورد بررسی قرار گرفت.

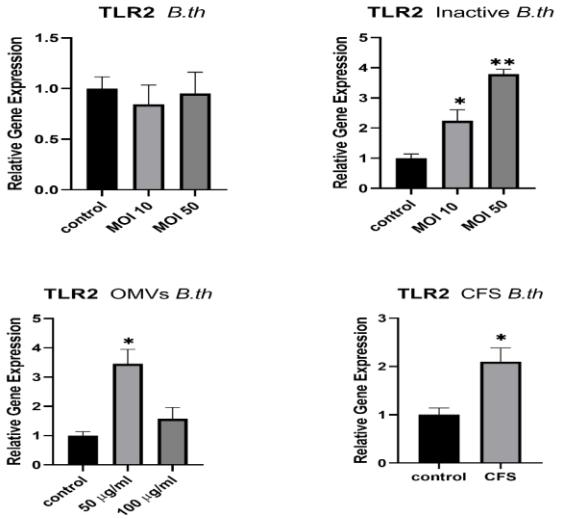
اثرات باکتری *B.thetaiotaomicron* زنده و فعال، OMVs و CFS حاصل از آن و باکتری غیرفعال شده به واسطه حرارت، بر بیان ژن‌های *tlr4* در سطح رونویسی

چنانچه در نمودار ۲ نشان داده شده است، نتایج حاصل از تیمار ۲۴ ساعته سلول‌های STC-1 با باکتری زنده و فعال B.thetaiotaomicron در هردو MOIs، تغییر معنی‌داری برسطح mRNA ژن tlr4 ایجاد نکرد. این درحالی است که فرم غیرفعال شده این باکتری به واسطه حرارت، در MOI 10 (p=۰/۰۴۲) و MOI 50 (p=۰/۰۱) رونویسی این ژن را افزایش داد. وزیکول‌های استخراج شده از این باکتری در غلظت ۵۰ µg/ml موجب افزایش معنی‌دار (p=۰/۰۲۹) رونویسی ژن tlr4 شدند. سوپ سلولی فاقد سلول از باکتری مذکور نیز میزان mRNA این ژن را افزایش داد (p=۰/۰۳۴).

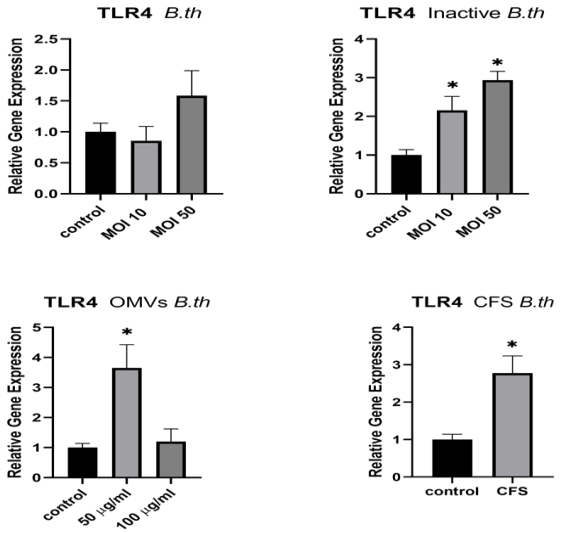
جدول۱. توالی پرایمرهای بکاررفته در واکنشqRT-PCR

primer Name	Sequence	Product size (bp)	Refrences
m- tlr2-forward	TCCTGCGAACTCCTATCC	151	(26)
m- tlr2 -reverse	CCTGGTGACATTCCAAGAC		
m-tlr4-forward	GCCTTTCAGGGAATTAAGCTCC	114	(26)
m-tlr4 -reverse	GATCAACCGATGGACGTGTAAA		
m-RPL19-forward	CCTGAAGGTCAAAGGGAATGTGTT	143	(27)
m-RPL19-reverse	GCTTTCGTGCTTCCTTGGTCTTA		

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-08]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.1.3]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.1]



نمودار۱. تغییر بیان ژن *tlr2* در رده سلولی STC-1 بعد از تیمار ۲۴ ساعته با ا لف) باکتری *B.thetaiotaomicron* فعال در ۱۰MOI و ۵۰MOI ب) غیرفعال شده بواسطه حرارت در ۱۰MOI و MOI ۵۰ ج) وزیکول های استخراج شده از باکتری(OMVs) در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر د) سوپ سلولی فاقد سلول (CFS)25%
** ($p<0.01$) * ($p<0.05$) از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. به عنوان کنترل داخلی از ژن RPL19 استفاده شد.
این آزمایش بصورت سه بار تکرار انجام گرفته است.



نمودار۲. تغییر بیان ژن tlr4 در رده سلولی STC-1 بعد از تیمار ۲۴ ساعته با ا لف) باکتری *B.thetaiotaomicron* فعال در ۱۰MOI و ۵۰MOI ب) غیرفعال شده بواسطه حرارت ۱۰MOI و MOI ۵۰ج) وزیکول های استخراج شده از باکتری(OMVs) در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر د) سوپ سلولی فاقد سلول (CFS)25%
** ($p<0.01$) * ($p<0.05$) از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. به عنوان کنترل داخلی از ژن RPL19 استفاده شد.
این آزمایش بصورت سه بار تکرار انجام شده است.

بحث

پروبیوتیک‌ها باکتری‌هایی هستند که به عنوان مکمل-های غذایی مصرف می‌شوند (۲۹)، پروبیوتیک‌ها از طریق فعال کردن گیرنده‌های TLR2, 4 و به دنبال آن مسیر های آبشاری NF-kB, PI3K , و MAPK و فعال کردن پاسخ‌های ایمنی سلول‌های اپیتلیالی و سلول‌های ایمنی در روده شده و موجب بهبود عملکرد سد اپیتلیالی و افزایش بیان پروتئین‌های اتصالات محکم و مقاومت روده در برابر نشت عوامل بیماری‌زا می‌شوند (۲۰)، تحقیقات نشان داده است که TLR2,4 در روده نقش مهم و ضروری در شناسایی و فعالسازی سیستم ایمنی ذاتی ، پس از مواجهه با باکتری‌ها برعهده دارند (۳۰). دراین پژوهش از باکتری *B. thetaiotaomicron* و OMVهای حاصل از آن و همچنین باکتری غیر فعال شده توسط حرارت و سوپر ناتانت باکتری ، به عنوان تیمار رده سلولی STC-1 ، جهت بررسی تغییرات بیان ژن‌های *tlr2,4*، در سطح رونویسی استفاده شده است. در تحقیق حاضر، رده سلولی STC-1 به عنوان مدل بررسی استاندارد سلول‌های انتروآندوکرین، جهت بررسی بیان TLRها به کار رفته است (۲۱).

در این مطالعه، باکتری *B. thetaiotaomicron* که یکی از اعضای مهم خانواده باکتروئیدت و به عنوان کومنسال مفید شناخته می شود، انتخاب شده است، این باکتری به جهت دارا بودن انواع آنزیم های گلیکوزید هیدرولازی از اهمیت خاصی در بین میکروبیوتای روده برخوردار است و امروزه به عنوان کاندیدای نسل جدید پروبیوتیک‌ها مطرح است (۱۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمارهای *B. thetaiotaomicron* فعال و زنده در هر دو ۱۰MOI و MOI ۵۰ تغییر معنی‌داری در بیان دو ژن *tlr2,4* در رده سلولی STC-1 در سطح mRNA ایجاد نکردند. تحقیقات نشان داده است که مکانیسم های عمل پروبیوتیک اغلب به ویژگی خاص سویه های باکتری بستگی دارد و پروبیوتیک‌ها و مشتقات آنها می‌توانند پاسخ‌های متنوعی را ایجاد کنند (۲۰).

Finamore و همکارانش در مطالعه‌ای که با استفاده از دو باکتری انتروتوکسیژنیک اشرشیاکلی، لاکتوباسیلوس رامنوس و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس رامنوس، بر روی رده سلولی Caco2 انجام شد، نشان دادند که لاکتوباسیلوس رامنوس فعالیت مسیرهای سیگنالینگ TLR4 را سرکوب می‌کند (۳۱).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-08]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.1.3]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.1]

Ganguli و همکارانش در مطالعه‌ای که با استفاده از رده سلولی Caco2 تحت تیمار با باکتری لاکتوباسیلوس رامنوس انجام گرفت، دریافتند که بیان ژن‌های *TNFα, IL 1β, IL8* در سلول‌های اپیتلیال روده ی جنین انسان به صورت معنی‌داری کاهش داشته است که موجب افزایش ایمنی گردیده است (۳۱).

یکی از مسیرهای ارتباطی باکتری *B.thetaiotaomicron* با میزبان، تولید OMVاست. OMVها نیز زیر مجموعه پست-بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند وضعیت نانواندازه وغیرتکثیری، OMVsها همراه با مقاومت در برابر تخریب آنزیم و pHکم، درکنار توانایی آنها در تعامل با میزبان، آن‌ها را به عنوان کاندید ایده آل برای رساندن مواد بیولوژیک به سایت‌های مخاطی، مانند دستگاه گوارش تبدیل می‌کند (۲۹, ۳۲, ۳۳) . در پژوهش حاضر، نتایج تیمار ۲۴ ساعته سلول های STC-1 با OMVs حاصل از باکتری B.thetaiotaomicron حاکی از افزایش معنی‌دار بیان دوژن tlr2,4 در غلظت ۵۰µg/ml و بی اثر بودن غلظت۱۰۰ µg/ml بود.

در مطالعه‌ای نشان داده شده است که OMVهای *Bifidobacterium* و*Lactobacillus* که از باکتری‌های میکروبیوتای روده هستند، به شکل معنی‌داری فعالیت TLRsرا تغییر می‌دهند. این عملکرد OMVها تایید کننده نقش میکروبیوتای روده در پاسخ‌های دفاعی میزبان است (۳۴). Carvalho و همکارانش نیز نشان دادند کهOMVهای تولید شده توسط باکتری کومنسال *B. thetaiotaomicron* می‌تواند پاسخ‌های ایمنی میزبان را از طریق دستگاه گوارش فعال کند (۱۳). درمطالعه اشرفیان و همکارانش، تیمار باکتری اکرومانسیا و EVs حاصل از آن بر رده سلولی CACO2 انجام گرفت و مشخص شد که باکتری بیان دو ژن *tlr2* و*tlr4* را در سطح رونویسی به صورت معنی‌داری افزایش داده، در صورتی که تیمار با OMVs رونویسی این دوژن را کاهش دادند (۲۲)

احمدی و همکارانش اثر باکتری *B. fragilis* و OMVs حاصل از آن را بر رده سلولی Cacoo2 بررسی کردند و نشان دادند که این باکتری اثر معنی‌دار کاهشی بر ژن *tlr2* و افزایشی بر ژن *tlr4* دارد، در صورتی که تاثیرOMVs بسته به غلظت متفاوت گزارش شده است (۳۵) .

از آنجا که بر اساس تعاریف جدید سازمان بهداشت جهانی و سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد FAO از پروبیوتیک، سلول‌های غیرزنده و غیرفعال و متابولیت‌های سالم آن‌ها و به دلیل اثرات چشمگیری که بر سلامتی دارند پروبیوتیک محسوب می‌شوند (۲۹). در این مطالعه اثرات سوپرناتانت و باکتری غیرفعال به عنوان عوامل پارابیوتیک بر تغییر بیان دو ژن *tlr2,4* در رده سلولی STC-1 مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که دو عامل پارابیوتیک، باکتری غیر فعال و سوپر ناتانت به صورت قابل توجهی بیان دو ژن *tlr2,4* رادر رده سلولی STC-1 افزایش می‌دهند. این معنی دار بودن نشان دهنده ویژگی ایمنی‌زایی این دو عامل است و نقش مهم عوامل پارابیوتیک را در تقویت سیستم ایمنی نشان می‌دهد. همچنین افزایش این دوژن TLR2,4 در اثر مشتقات پروبیوتیک *B.thetaiotaomicron* شامل باکتری غیرفعال و سوپرناتانت حاصل از آن، نشان دهنده ایجاد شرایط سالم و پایدار در روده است.

در مطالعه‌ای که توسط Bermudez-Brito و همکارانش برای بررسی اثرات بیفیدوباکتریوم بِرِ رده CNCM-4035 به عنوان پروبیوتیک و سوپرناتانت آن روی پاسخ سلول‌های دندریتیک روده انسانی انجام گرفت، نشان داده شد که بیان ژن های *TLR1,2,5,9* تحت تاثیر سوپرناتانت نسبت به باکتری زنده به شکل چشمگیری افزایش داشته است (۳۶)

Malago و همکارانش نیز در مطالعه دیگری با استفاده از لاکتوباسیلوس کازیی ولاکتوباسیلوس پلانتاروم به عنوان پروبیوتیک و سوپرناتانت در رده سلولی Caco2 دریافتند که سوپرناتانت باعث کاهش معنی‌دار در سطح IL8 گردید و خواص ضد التهابی بیشتری از باکتری زنده نشان داد (۳۷).

مکانیسم اثرات پروبیوتیک‌ها برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های روده از جمله درماتیت آتوپیک، انتروکولیت نکروز، و اولسراتیوکولیت، احتمالاً به دلیل تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم آنها بر روی سیستم ایمنی روده است و مهم‌تر آن است که بدانیم پروبیوتیک‌ها برای تعدیل پاسخ‌های ایمنی بدن انسان نقش بسیار کلیدی و ضروری دارند (۳۸).

استفاده از پروبیوتیک‌ها و مشتقات آنها برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و عفونت‌های میکروبی به عنوان جایگزینی برای داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیک‌ها (به دلیل عوارض جانبی فراوان)، یکی داغ‌ترین مسایل روز پزشکی محسوب می‌شود (۲۵).

در مجموع ما در این مطالعه نشان دادیم که سوپ سلولی فاقد باکتری و باکتری غیر فعال تاثیر مثبت معنی‌داری در افزایش بیان دو ژن *tlr2,4* و افزایش ایمنی ایجاد کردند. قابل ذکر است که این عوامل به جهت دارا بودن انواع متابولیت‌ها و MAMPهای باکتریایی و همچنین عدم تکثیر این ساختارها که حتی در شرایط Leaky Gut و وجود انواع زخم‌های دستگاه گوارش، اختلال در بدن ایجاد نمی‌کنند، و باتوجه به ایمن‌تر

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-08]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.1.3]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.1]

بودن این عوامل نسبت به باکتری زنده، حتی در حالت وجود نشت سد سلولی و نقص سیستم ایمنی میزبان می‌تواند در درمان بسیاری از بیماری‌های التهابی برای تنظیم یکپارچگی سد روده و کاهش التهاب استفاده شوند. تحقیقات بیشتر برای تأیید این نتایج بسیار مهم است.

REFERENCES

1. Fujimura KE, Slusher NA, Cabana MD, Lynch SV. Role of the gut microbiota in defining human health. Expert Rev Anti Infect Ther 2010;8(4):435-54.

2. Tanagho PA, Shohdy KS. GPR 120: The Potential Target for Obesity Treatment. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2016;16:8-11.

3. Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, Cotter PD. Beneficial modulation of the gut microbiota. FEBS Lett 2014;588:4120-30.

4. Kho ZY, Lal SK. The human gut microbiome–a potential controller of wellness and disease. Front Microbiol 2018:1835.

5. Hooks KB, O'Malley MA. Dysbiosis and its discontents. MBio 2017;8:e01492-17.

6. Di Lorenzo F, De Castro C, Silipo A, Molinaro A. Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions. FEMS Microbiol Rev 2019;43:257-72.

7. Behrouzi A, Mazaheri H, Falsafi S, Tavassol ZH, Moshiri A, Siadat SD. Intestinal effect of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 and its OMV. J Diab Metab Disord 2020;19:597-604.

8. Sharifi L, Aghamohammadi A, Mohsenzadegan M, Rezaei N, Towfighi Zavareh F, Moshiri M, et al. Immunomodulation of TLR2 and TLR4 by G2013 (alfa-L-Guluronic acid) in CVID Patients. Int J Pediatr 2017;5:5327-37.

9. Chen C-Y, Kao C-L, Liu C-M. The cancer prevention, anti-inflammatory and anti-oxidation of bioactive phytochemicals targeting the TLR4 signaling pathway. Int J Mol Sci 2018;19:2729.

10. Llewellyn A, Foey A. Probiotic modulation of innate cell pathogen sensing and signaling events. Nutrients 2017;9:1156.

11. Molina-Tijeras JA, Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME. The immunomodulatory properties of extracellular vesicles derived from probiotics: a novel approach for the management of gastrointestinal diseases. Nutrients 2019;11:1038.

12. Wegh CA, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. Int J Mol Sci 2019;20:4673.

13. Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EM, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2021;18:649-67.

14. Teame T, Wang A, Xie M, Zhang Z, Yang Y, Ding Q, et al. Paraprobiotics and postbiotics of probiotic lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms: a review. Front Nutr 2020;7:570344.

15. Chang C-J, Lin T-L, Tsai Y-L, Wu T-R, Lai W-F, Lu C-C, et al. Next generation probiotics in disease amelioration. J Food Drug Anal 2019;27:615-22.

16. Thompson AJ, Spears RJ, Zhu Y, Suits MD, Williams SJ, Gilbert HJ, et al. Bacteroides thetaiotaomicron generates diverse α-mannosidase activities through subtle evolution of a distal substrate-binding motif. Acta Crystallogr D Struct Biol 2018;74:394-404.

17. Carvalho AL, Fonseca S, Miquel-Clopés A, Cross K, Kok K-S, Wegmann U, et al. Bioengineering commensal bacteria-derived outer membrane vesicles for delivery of biologics to the gastrointestinal and respiratory tract. J Extracell Vesicles 2019;8:1632100.

18. Huang-Doran I, Zhang C-Y, Vidal-Puig A. Extracellular vesicles: novel mediators of cell communication in metabolic disease. Trends Endocrinol Metab 2017;28:3-18.

19. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. BioMed Res Int 2018;2018.

20. Fujita Y, Kadota T, Araya J, Ochiya T, Kuwano K. Extracellular vesicles: new players in lung immunity. Am J Respir Cell Mol Biol 2018;58:560-65.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-08]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.1.3]

[DOI: 10.52547/iau.33.1.1]

21. Ashrafian F, Behrouzi A, Badi SA, Davari M, Jamnani FR, Fateh A, et al. Comparative study of effect of Akkermansia muciniphila and its extracellular vesicles on toll-like receptors and tight junction. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2019;12:163.

22. Valguarnera E, Scott NE, Azimzadeh P, Feldman MF. Surface exposure and packing of lipoproteins into outer membrane vesicles are coupled processes in Bacteroides. MSphere 2018;3:e00559-18.

23. Badi SA, Moshiri A, Marvasti FE, Mojtahedzadeh M, Kazemi V, Siadat SD. Extraction and evaluation of outer membrane vesicles from two important gut microbiota members, Bacteroides fragilis and Bacteroides thetaiotaomicron. Cell J (Yakhteh) 2020;22:344.

24. Wei S-H, Chen Y-P, Chen M-J. Selecting probiotics with the abilities of enhancing GLP-1 to mitigate the progression of type 1 diabetes in vitro and in vivo. Journal of Functional Foods 2015;18:473-86.

25. DW sJaR, eds. Molecular cloninig:a laboratory manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

26. Ashrafian F, Shahriary A, Behrouzi A, Moradi HR, Keshavarz Azizi Raftar S, Lari A, et al. Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles as a mucosal delivery vector for amelioration of obesity in mice. Front Microbiol 2019;10:2155.

27. Bonomi L, Brown M, Ungerleider N, Muse M, Matzuk MM, Schneyer A. Activin B regulates islet composition and islet mass but not whole body glucose homeostasis or insulin sensitivity. Am J Physiol Endocrinol Metab 2012;303:E587-96.

28. Motta EVS, Powell JE, Leonard SP, Moran NA. Prospects for probiotics in social bees. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2022;377:20210156.

29. Korotkyi O, Huet A, Dvorshchenko K, Kobyliak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Probiotic composition and chondroitin sulfate regulate TLR-2/4-mediated NF-κB inflammatory pathway and cartilage metabolism in experimental osteoarthritis. Probiotics Antimicrob Proteins 2021;13:1018-32.

30. Ganguli K, Collado MC, Rautava J, Lu L, Satokari R, von Ossowski I, et al. Lactobacillus rhamnosus GG and its SpaC pilus adhesin modulate inflammatory responsiveness and TLR-related gene expression in the fetal human gut. Pediatr Res 2015;77:528-35.

31. Zhang B, Zhao J, Jiang M, Peng D, Dou X, Song Y, et al. The Potential Role of Gut Microbial-Derived Exosomes in Metabolic-Associated Fatty Liver Disease: Implications for Treatment. Front Immunol 2022;13.

32. Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. Int J Mol Sci 2019;20:4673.

33. Van Bergenhenegouwen J, Kraneveld AD, Rutten L, Kettelarij N, Garssen J, Vos AP. Extracellular vesicles modulate host-microbe responses by altering TLR2 activity and phagocytosis. PloS One 2014;9:e89121.

34. Badi SA, Khatami S, Irani S, Siadat SD. Induction effects of bacteroides fragilis derived outer membrane vesicles on toll like receptor 2, toll like receptor 4 genes expression and cytokines concentration in human intestinal epithelial cells. Cell J (Yakhteh) 2019;21:57.

35. Bermudez-Brito M, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Matencio E, Bernal MJ, Romero F, et al. Cell-free culture supernatant of Bifidobacterium breve CNCM I-4035 decreases pro-inflammatory cytokines in human dendritic cells challenged with Salmonella typhi through TLR activation. PloS One 2013;8:e59370.

36. Malago J, Tooten P, Koninkx JF. Anti-inflammatory properties of probiotic bacteria on Salmonella-induced IL-8 synthesis in enterocyte-like Caco-2 cells. Benef Microbes 2010;1:121-30.

37. Tursi A, Brandimarte G, Papa A, Giglio A, Elisei W, Giorgetti GM, et al. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL# 3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. Am J Gastroenterol 2010;105:2218.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-08]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.1.3]

[DOI: 10.52547/iau.33.1.1]